

# 源于地龙蛋白的抗氧化肽鉴定与构效关系

张祎<sup>1</sup>, 周飞燕<sup>2</sup>, 潘蕾蔓<sup>1</sup>, 贺萍<sup>1</sup>, 张艺哲<sup>1</sup>, 杨锦熹<sup>1</sup>, 黄明<sup>2</sup>, 吴晖<sup>\*</sup>, 张猛猛<sup>1\*</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 广州白云山维一实业股份有限公司, 广东广州 511458)

**摘要:** 为探究外源蛋白酶预酶解处理对地龙蛋白胃肠消化程度和胃肠消化后抗氧化活性的影响。该研究利用五种蛋白酶制备了不同的地龙蛋白酶解物, 然后通过体外胃肠模拟消化探究这些酶解物的水解度、分子量分布和体外抗氧化活性的变化。五种蛋白酶解物中, 碱性蛋白酶酶解物的水解度最高, 为 40.8%, 其对 DPPH、ABTS 自由基的清除能力分别为 27.36、175.46  $\mu\text{mol TE/g}$ , ORAC 值为 0.70  $\mu\text{mol TE/mg}$ 。碱性蛋白酶酶解物经胃肠消化后的水解度、DPPH 自由基清除率、ORAC 值相比于地龙蛋白直接胃肠消化所得产物 (EWP) 分别提高了 94.06%、72.21% 及 120.00%。GHEWP 中鉴定出 10 823 条分子量 <3 ku 的肽, 通过 bioware.ucd.ie 进行活性阈值评分筛选出活性评分最高的 11 个肽进行合成, 验证活性, 其中 ATSGFFVY、HCFVLY、HLASGWY、HRYSDF、HYANMY 的综合抗氧化能力较好, 量子化学计算结果表明: ATSGFFVY、HCFVLY、HRYSDF、HYANMY 的活性位点可能分别位于 Tyr-8、Tyr-6、Tyr-3、Tyr-2 上; HLASGWY 的活性位点可能位于 Trp-6 上。该研究表明碱性蛋白酶预酶解可提高地龙蛋白的消化程度, 增强其胃肠消化产物的抗氧化活性。

**关键词:** 地龙蛋白; 多肽; 模拟胃肠消化; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2023)03-164-173

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0521

## Identification and Structure-activity Relationships of Antioxidant Peptides

### Derived from Earthworm Proteins

ZHANG Yi<sup>1</sup>, ZHOU Feiyan<sup>2</sup>, PAN Leiman<sup>1</sup>, HE Ping<sup>1</sup>, ZHANG Yizhe<sup>1</sup>, YANG Jinxi<sup>1</sup>, HUANG Ming<sup>2</sup>, WU Hui<sup>1\*</sup>,  
ZHANG Mengmeng<sup>1\*</sup>

(1.School of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Guangzhou Baiyunshan Weiyi Industrial Co. Ltd., Guangzhou 511458, China)

**Abstract:** The effects of exogenous protease pre-enzymolysis treatment on the degree of gastrointestinal digestion and antioxidant activity of earthworm proteins were examined following gastrointestinal digestion. Five proteases were used to prepare different hydrolysates of earthworm proteins, and changes in the degree of hydrolysis, molecular weight distribution, and *in vitro* antioxidant activities of these enzymatic hydrolysates were investigated based on simulated gastrointestinal digestion *in vitro*. Among these hydrolysates, the degree of hydrolysis of the alkaline protease hydrolysate was the highest at 40.81%. The rates of DPPH and ABTS free radical scavenging were 27.36 and 175.46  $\mu\text{mol TE/g}$ , respectively, and the ORAC value was 0.70  $\mu\text{mol TE/mg}$ . Following gastrointestinal digestion, the degree of hydrolysis, rate of DPPH free radical scavenging, and ORAC value of the alkaline protease hydrolysate increased by 94.06%, 72.21%, and 120%, respectively, compared with the products obtained via direct gastrointestinal digestion of earthworm proteins. A total of 10 823 peptides with molecular weight <3 ku were identified in GHEWP, and 11 peptides with the highest activity scores were screened using bioware.ucd.ie to determine their activity threshold

引文格式:

张祎,周飞燕,潘蕾蔓,等.源于地龙蛋白的抗氧化肽鉴定与构效关系[J].现代食品科技,2023,39(3):164-173.

ZHANG Yi, ZHOU Feiyan, PAN Leiman, et al. Identification and structure-activity relationships of antioxidant peptides derived from earthworm proteins [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 164-173.

收稿日期: 2022-04-26

基金项目: 广州市基础与应用基础研究项目 (202102020773); 中国博士后自然科学基金面上项目 (2019M662931)

作者简介: 张祎 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: 201921026196@mail.scut.edu.cn

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: fehwu@scut.edu.cn; 共同通讯作者: 张猛猛 (1989-), 男, 博士, 研究方向: 天然产物的结构与功能活性, E-mail: zhangmengmengscut@126.com

score for synthesis and verification. Among these, the peptides ATSGFFVY, HCFVLY, HLASGWY, HRYSDF, and HYANMY had the highest comprehensive antioxidant capacities. The quantum chemical calculation results revealed that the active sites of ATSGFFVY, HCFVLY, HRYSDF and HYANMY might be located at Tyr-8, Tyr-6, Tyr-3, and Tyr-2, respectively, and the active site of HLASGWY may be located at Trp-6. The findings of this study indicate that pre-enzymatic hydrolysis using alkaline protease can enhance the degree of digestion of earthworm proteins and also the antioxidant activity of their gastrointestinal digestion products.

**Key words:** earthworm protein; polypeptide; simulated gastrointestinal digestion; antioxidant activity

地龙是我国重要的中药材之一,已有众多研究表明地龙有降血压、抗血栓、平喘止咳、促进创面愈合、抗肿瘤等药理作用<sup>[1]</sup>。地龙富含人体所需营养物质,包括蛋白质、核苷酸、微量元素、维生素等,其中蛋白质是地龙的主要成分,占比约为其干重的 56%~66%<sup>[2,3]</sup>。地龙蛋白在 2009 年被国家卫生部认定为“新资源食品”。目前已有多项研究表明地龙发挥降压、溶栓、抗癌等生物功效与其蛋白质有关<sup>[4-6]</sup>。

氧化应激可导致许多慢性疾病,如心血管疾病、阿尔茨海默病和癌症等<sup>[7]</sup>。活性氧(ROS)的过度积累会引起氧化应激,从而导致对细胞生物分子的氧化损伤,例如 DNA 断裂、蛋白质变性和生物膜脂质过氧化等<sup>[8]</sup>。已有科学研究表明,补充抗氧化剂可能有助于维持自由基损伤和氧化防御之间的平衡<sup>[9]</sup>。因此,近年来利用食物蛋白制备的抗氧化肽受到普遍关注<sup>[10]</sup>。有研究表明,地龙在体内具有抗氧化功能<sup>[11]</sup>。而且已有很多研究表明食物中的蛋白质经胃肠消化后会产生抗氧化肽<sup>[12,13]</sup>。因此,地龙的抗氧化作用可能也与其蛋白质有关。

由于很多蛋白质直接食用的消化率不高,产生的活性肽较少,因此,许多研究尝试使用碱性蛋白酶、复合蛋白酶等外源蛋白酶对蛋白质进行预酶解,以达到提高蛋白质在胃肠道的消化程度和功能活性的目的。Esprjo 等<sup>[14]</sup>报道枯草杆菌蛋白酶预处理后的山羊奶蛋白经胃肠消化后所得产物的 ACE 抑制活性、抗氧化活性相比于直接消化产物显著提高。马思彤等<sup>[15]</sup>报道相比于直接胃肠消化,碱性蛋白酶处理后所得蛋清肽的抗氧化能力显著增强。孙崇臻<sup>[16]</sup>报道桑叶蛋白经中性蛋白酶预处理后桑叶肽的金属螯合能力有所提升。然而目前尚未有研究探究外源蛋白酶预处理对地龙蛋白胃肠消化后的抗氧化活性的影响。此外,蛋白酶解物中的蛋白片段或肽经口服后还会经过胃肠道中蛋白酶的进一步降解。也就是说,蛋白酶解物真正在体内发挥各种生理活性的是其经胃肠道消化所产生的肽。因此,探究外源蛋白酶对地龙蛋白抗氧化活性的影响,并解析地龙蛋白酶解物经胃肠消化后所产生的抗氧化肽的序列及构效关系,对于地龙蛋白资源的开发利用,以及了解地龙蛋白发挥抗氧化活性的物质基

础具有重要的科学意义。

本研究将首先探究地龙蛋白经碱性蛋白酶、中性蛋白酶等五种蛋白酶酶解后的抗氧化活性的变化,然后通过模拟胃肠道消化,探究酶解物消化产物的酶解程度和抗氧化活性,并解析消化产物中的肽的序列,利用量子化学计算方法分析抗氧化肽的构效关系。本文将在地龙蛋白在功能性食品领域中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

地龙(产自广西),采购自天福百味堂;碱性蛋白酶(100 U/mg)、木瓜蛋白酶(800 U/mg)、菠萝蛋白酶(300 U/mg)、复合蛋白酶(120 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg),上海源叶生物科技有限公司;胃蛋白酶( $\geq 250$  units/mg),胰酶(8×USP),美国 Sigma 公司;L-亮氨酸,麦克林试剂;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS),美国 sigma 公司;2,2-偶氮氮(二异丁基脒)二盐酸盐(AAPH)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉)二胺盐(ABTS),生工生物工程(上海)有限公司;福林酚,北京索莱宝科技有限公司;PBS 缓冲液(pH 值 7.4)、酪蛋白、荧光素钠、Trolox、无水乙醇、无水碳酸钠、氢氧化钠、硫酸铜、酒石酸钾钠,均为市售分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

真空冷冻干燥机、精密 pH 计、恒温摇床、磁力搅拌器、紫外可见分光光度计、高速冷冻离心机、超声细胞粉碎仪、分析天平。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 地龙蛋白的提取

干燥至恒重的地龙粉碎过筛,将粉末与蒸馏水按照 1:25 (m/V) 比例混合均匀,用 1 mol/L 的 NaOH 溶液将混合溶液体系 pH 值调至 11,超声粉碎 20 min,磁力搅拌提取 2 h 后,用高速冷冻离心机以 8 000 r/min 转速离心 15 min 后,取出上清液。用 1 mol/L HCl 将

上清液 pH 值调至 4.5, 放于 4 °C 冰箱中静置 2 h, 以 8 000 r/min 转速离心 15 min, 弃去上清, 得沉淀蛋白。沉淀蛋白取出用蒸馏水复溶, 将 pH 值调节至 7.0, 用 3.5 ku 透析袋透析脱盐, 预冻后进行真空冷冻干燥, 干燥后的地龙蛋白粉末保存在 -20 °C 备用, 标记为 EWP (蛋白纯度为 96.03%)。

### 1.3.2 地龙蛋白的单酶酶解

表一为经过正交优化后地龙蛋白的酶解条件。用蒸馏水配制 1.25% (m/V) 的地龙蛋白溶液, 沸水中加热 10 min。分别取 100 mL 至 5 个 250 mL 烧杯中, 按照表 1 的条件进行酶解。酶解完成后, 酶解液沸水浴 10 min 终止酶解反应。调回酶解液 pH 值至中性, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用截流量 100 u 的透析袋透析。之后, 将酶解液冷冻干燥, 于 -20 °C 保存备用。

表 1 酶解参数

Table 1 Enzymatic hydrolysis parameters

蛋白酶种类	碱性蛋白酶	中性蛋白酶	菠萝蛋白酶	复合蛋白酶	木瓜蛋白酶
适宜温度/°C	50~60	45	35~55	35~60	45~60
适宜 pH 值	8.0~9.0	6.0~7.0	6.0~7.5	5.5~7.5	6.0~7.5
实际酶活力/(U/mg)	258	114	369	62	423
酶解温度/°C	55	45	55	45	55
酶解 pH 值	8.5	7	7	7	7
加酶量/U	2.5×10 <sup>4</sup>				
酶解时间/h	3	3	3	3	3

各蛋白酶的活力测定方法: 中性蛋白酶及碱性蛋白酶酶活力的测定方法参照 GB/T 23527-2009 中紫外分光光度法; 木瓜、菠萝及复合蛋白酶酶活力的测定方法参照 T/CCCMHPIE 1.18-2016。

### 1.3.3 地龙蛋白及酶解物的模拟消化

分别取 100 mL 1.25% (m/V) 的地龙蛋白溶液 (EWP)、1.3.2 中抗氧化活性最好的蛋白水解液 (AH) 模拟胃肠消化, 参照 Brodtkorb 等<sup>[17]</sup>方法略作修改。用 1 mol/L HCl 调节待消化溶液 pH 值至 3.0, 然后加入胃蛋白酶 (2 000 U/mL) 进行胃消化, 37 °C、100 r/min 孵育 2 h。之后用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 加入胰酶 (100 U/mL) 进行肠消化, 混合溶液继续 37 °C、100 r/min 孵育 2 h。沸水浴 10 min 终止酶解反应。冷却离心后, 取上清, 用 100 u 透析袋透析脱盐。冷冻干燥后于 -20 °C 保存备用, EWP 和 AH 的胃肠消化产物分别标记为 GEWP、GHEWP。

### 1.3.4 水解度的测定

参考罗艳华等<sup>[18]</sup>的方法略作修改。取 1 mL 稀释一定倍数的酶解液, 加入 1 mL pH 值 8.2 的磷酸盐缓冲液和 1 mL 0.05% (m/V) TNBS 溶液, 50 °C 水浴避光反应 1 h, 反应结束后, 加入 2 mL HCl (0.1 mol/L) 终止反应, 震荡混匀后加入 5 mL 去离子水, 继续震荡使其混合均匀, 冷却至室温后在 340 nm 下测量吸光值。以 L-亮氨酸绘制标准曲线, 计算  $\alpha$ -氨基酸含量。

### 1.3.5 分子量分布测定

参照 GB/T 22729-2008 进行。将 1 mg/mL 的酶解产物溶液经 0.45  $\mu$ mol/L 微孔过滤膜过滤后进 TSK-GEL G2000SWXL 色谱柱, 以细胞色素 C ( $M_w$

12400)、杆菌酶 ( $M_w$  1450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 ( $M_w$  451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 ( $M_w$  189) 为标准品, 测定酶解物的相对分子量分布。高效液相色谱仪条件: 色谱柱 TSK-GEL G2000SWXL, 7.8 mm×300 mm; 流动相, 乙腈/水/三氟乙酸, 45/55/0.1 (V/V); 检测: UV 220 nm; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 °C。以标准品的  $\lg(M_w)$  及洗脱时间作标准曲线 ( $y=-0.232x+6.85$ ,  $R^2=0.9985$ )。

### 1.3.6 酶解产物抗氧化活性测定

#### 1.3.6.1 DPPH 自由基清除能力

参考 Lu 等<sup>[19]</sup>的方法略作修改, 配制一定浓度样品溶液及 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液, 取样品溶液 2 mL, 加入 2 mL DPPH 乙醇溶液, 振荡摇匀, 室温下避光反应 30 min, 后以溶剂作空白对照于 517 nm 处测定吸光值, 以 Trolox 作阳性对照, 以 Trolox 浓度为横坐标、自由基清除率为纵坐标绘制标准曲线 ( $y=0.7578x-3.0023$ ,  $R^2=0.9959$ )。

$$S_D = \left(1 - \frac{OD_1 - OD_0}{OD_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$S_D$ ——DPPH 自由基清除率, %;

$OD_1$ ——实验组的吸光度;

$OD_0$ ——空白组的吸光度。

#### 1.3.6.2 ABTS 自由基清除能力

参考 Lu 等<sup>[19]</sup>的方法略作修改, 配置一定浓度的样品溶液, 在离心管中依次加入 300  $\mu$ L 样品溶液和 3 mL ABTS 自由基溶液, 将反应液漩涡震荡混合均匀, 室温避光反应 6 min 后于 734 nm 处测量吸光值, 以

Trolox 作阳性对照,以 Trolox 浓度为横坐标、自由基清除率为纵坐标绘制标准曲线 ( $y=0.2213x+2.1726$ ,  $R^2=0.9972$ ),以蒸馏水作空白对照。

$$S_A = \left(1 - \frac{OD_3 - OD_2}{OD_2}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$S_A$  —— ABTS 自由基清除率, %;

$OD_3$  —— 实验组的吸光度;

$OD_2$  —— 空白组的吸光度。

### 1.3.6.3 ORAC 法测定样品抗氧化能力

参考 Wu 等<sup>[20]</sup>的方法,略作修改,用 pH 值 7.4 的 PBS 缓冲液分别配制 168 nmol/L 的荧光素钠溶液、24.16 mmol/L 的 AAPH 溶液、100  $\mu$ mol/L 的 Trolox 溶液及样品溶液。在 96 孔板中分别加入样品溶液 25  $\mu$ L、荧光素钠溶液 75  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 预热 5 min 后迅速在各孔中加入 100  $\mu$ L AAPH 溶液启动反应,在 37  $^{\circ}$ C 以激发波长 485 nm、发射波长 538 nm 2 h 连续测定各孔荧光强度,每 5 min 读取一次荧光值。设置分别用 Trolox、荧光素钠、PBS 溶液替代样品溶液的阳性对照组、空白组和 AAPH 组。

$$ORAC = \frac{AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{+AAPH}}}{AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{+AAPH}}} \times \frac{C_1}{C_2} \quad (3)$$

式中:

ORAC —— 抗氧化能力指数;

$AUC_{\text{sample}}$  —— 样品溶液荧光衰退曲线面积;

$AUC_{\text{+AAPH}}$  —— 加 AAPH 溶液荧光衰退曲线面积;

$AUC_{\text{Trolox}}$  —— Trolox 溶液荧光衰退曲线面积;

$C_1$  —— Trolox 溶液的浓度,  $\mu$ mol/L;

$C_2$  —— 样品溶液浓度, mg/L。

### 1.3.7 消化产物的氨基酸序列鉴定

GHEWP 中  $M_w < 3$  ku 的氨基酸序列的鉴定在武汉百杜生物科技有限公司采用 LC-MS/MS 完成。具体步骤为:取 GHEWP 中分子量  $< 3$  ku 的超滤组分在溶解液 ( $\varphi=0.1\%$  甲酸、 $\varphi=2\%$  乙腈) 中溶解,充分震荡均匀,4  $^{\circ}$ C 下 13 200 r/min 离心 20 min,取上清,进行质谱鉴定。具体参数如下:一级质谱参数,分辨率:70 000、AGC:目标  $3e6$ 、最大喷射时间:40 ms、扫描范围:350~1 800  $m/z$ ;二级质谱参数,分辨率:

17 500、AGC 目标:  $1e5$ 、最大喷射时间:60 ms、TopN:20、NCE/stepped NCE:27。质谱原始文件转换处理后,用 MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) 检索 uniprot 数据库,解析二级质谱数据。

### 1.3.8 反向合成多肽

根据 LC-MS/MS 鉴定出的多肽序列,通过 Peptide Rank 程序和 BIOPEP 数据库<sup>[21]</sup>进行活性评分,选定评分前 11 的肽在上海吉尔生物公司进行合成,纯度达 95%。

### 1.3.9 合成肽的抗氧化活性测定

方法同 1.3.6。DPPH、ABTS 和 ORAC 值测定试验中样品浓度分别为 1、0.5、15.625  $\mu$ g/mL。

### 1.3.10 量子化学法推测抗氧化肽活性位点

使用 Chemdraw 软件绘制各肽的分子结构式,将结果输入 Chem3D 获得各肽的空间坐标并保存为 Gaussian Input 文件作为 Gaussian 16W 的输入文件,采用高精度的 DFT 法中 B3LYP/6-31G(d) 基组对抗氧化肽进行全几何结构优化,获得各肽的结构相关参数<sup>[22]</sup>。

### 1.3.11 数据分析

使用 Excel 2016、Origin 2022、SPSS 17.0 进行数据分析和作图,  $P < 0.05$  表示组间差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 五种蛋白酶酶解地龙蛋白的水解度

由表 2 可知,酶解 3 h 后,碱性蛋白酶酶解物(AH)的 DH 显著高于其他组 ( $P < 0.05$ ),可达 40.8%,中性蛋白酶酶解物(NH)、复合蛋白酶酶解物(PrH)次之,木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶对地龙蛋白的酶解能力最差。碱性蛋白酶酶解物取得较高水解度的原因可能与蛋白酶的作用位点及地龙蛋白的理化特性有关。碱性蛋白酶属的酶切位点主要是芳香族或疏水性氨基酸羧基端的肽键,相对于其他四种酶的作用范围更广<sup>[23]</sup>。此外,地龙蛋白是碱溶性蛋白,碱性条件有利于蛋白质分子在静电排斥作用下伸展,有利于碱性蛋白酶发挥作用。卢鑫等<sup>[24]</sup>和任尧<sup>[25]</sup>的研究也表明碱性蛋白酶对碱溶酸沉提取的蛋白质水解效果最好。

表 2 五种蛋白酶对水解度的影响

Table 2 Effects of five proteases on degree of hydrolysis

样品名称	AH	NH	BH	PrH	PaH
水解度/%	40.81 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	33.74 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	8.60 $\pm$ 0.64 <sup>c</sup>	25.67 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup>	10.18 $\pm$ 0.45 <sup>d</sup>

注: AH、NH、BH、PrH 及 PaH 分别对应碱性、中性、菠萝、复合及木瓜蛋白酶酶解物。同行右肩不同小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 酶解产物分子量的测定

在蛋白酶的作用下,蛋白质会水解为不同分子量的肽及游离氨基酸。表3展现了五种蛋白酶酶解物的分子量分布。氨基酸的平均分子量为180 u,因此表3中分子量小于180 u的组分应该是游离氨基酸。一般认为,抗氧化肽的分子量通常小于3 000 u,因为低分子量肽可以更好地与自由基反应<sup>[26,27]</sup>。比如Feng等<sup>[28]</sup>报道核桃蛋白水解物中 $M_w < 3$  ku的组分具有最好的抗氧化活性。Nattakarn等<sup>[29]</sup>报道蓖麻蛹酶解物中 $M_w < 3$  ku的组分具有很强的抗氧化活性。Bendea等<sup>[30]</sup>也报道分子量较低的肽组分的抗氧化活性更好。由表3可知,AH、NH、BH、PrH、PaH中中分子量在3 000 u以下的比例分别为95.09%、87.08%、51.20%、94.67%、67.63%,这暗示着AH、NH、PrH可能具有相对较好的抗氧化活性。

表3 酶解物的分子量分布

Table 3 Molecular weight distribution of hydrolysates

分子量范围/u	含量/%				
	AH	NH	BH	PrH	PaH
>10 000	0.67	2.92	28.42	0.52	12.4
10 000~5 000	1.46	4.45	9.9	1.77	9.48
5 000~3 000	2.77	5.55	10.49	3.03	10.7
3 000~2 000	3.56	6.15	9.10	3.56	10.44
2 000~1 000	12.51	16.58	15.33	11.54	19.86
1 000~500	28.91	32.33	12.71	28.56	19.64
500~180	43.10	28.43	8.96	44.74	14.3
<180	7.01	3.59	5.1	6.27	3.19

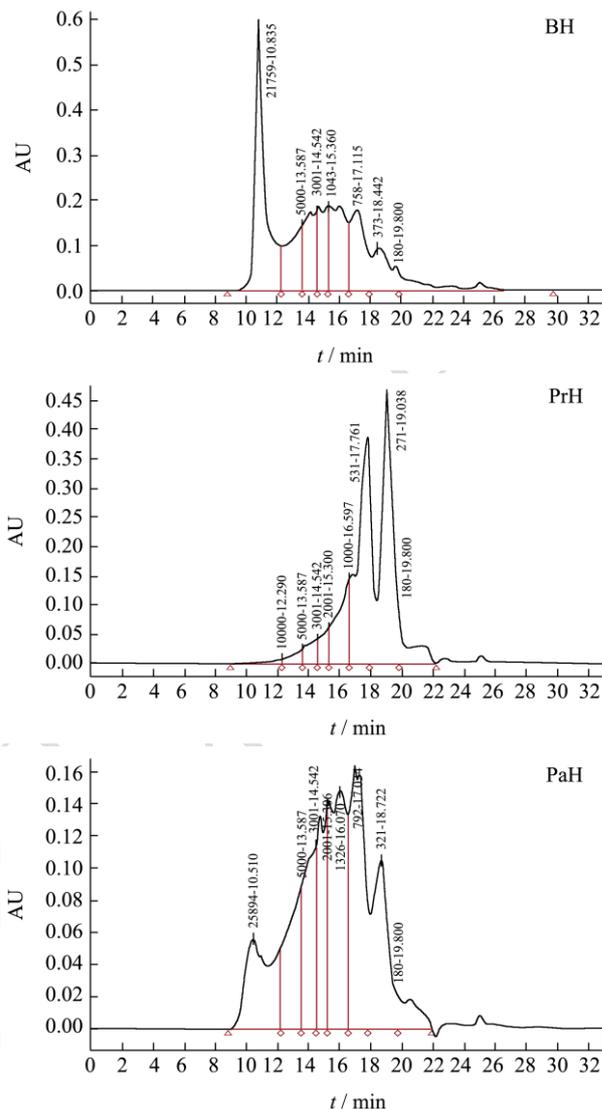
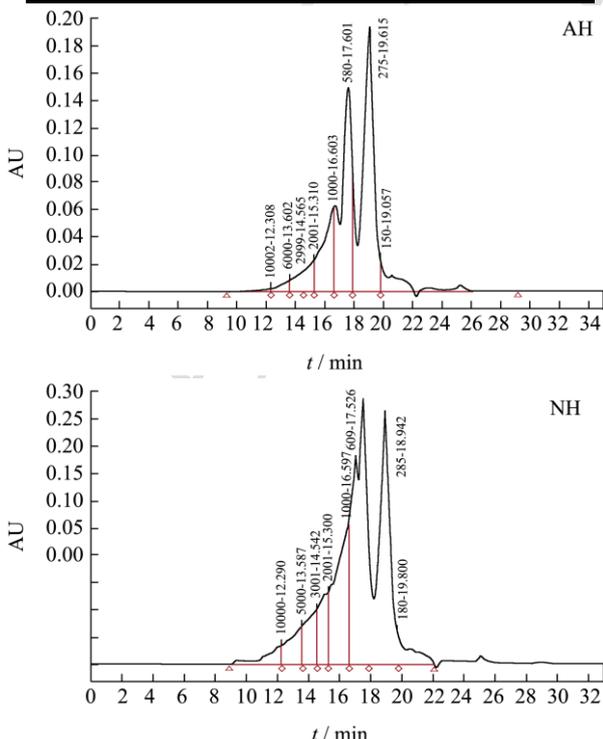


图1 酶解物的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatogram of enzymatic hydrolysate

## 2.3 酶解产物的抗氧化活性评价

为探究这五种蛋白酶解物的抗氧化活性,本文利用DPPH自由基清除实验、ABTS<sup>+</sup>自由基清除实验、ORAC实验评价了这五种蛋白酶解物的抗氧化活性。结果如表4所示。在DPPH自由基清除实验中,AH、NH和BH的清除能力较强;在ABTS<sup>+</sup>自由基清除实验中,AH、NH和PrH的清除能力较强;在ORAC实验中,AH、NH和BH展现的抗氧化活性较强。从这些实验结果中可以看出,不同的酶解物在不同的抗氧化实验体系中所展现出的抗氧化能力不同。造成这一差异的原因在于,不同实验体系所展现出的结果除了受样品的抗氧化能力影响,还受其理化性质的影响。比如,对于DPPH自由基清除实验,由于DPPH是一种亲脂性自由基,所以一般亲脂性较强的抗氧化物质



在该实验中会取得较好结果<sup>[31]</sup>; ABTS<sup>+</sup>是一种带正电荷的自由基, 可从抗氧化剂分子中获得一个电子形成稳定的中性分子, 所以带负电荷的抗氧化物质在该实

验中展现的抗氧化效果较好<sup>[32]</sup>; ORAC 实验中的自由基为 AAPH 溶于水后释放的自由基, 亲水性较强的物质能更好地清除这些自由基<sup>[33]</sup>。

表 4 五种酶解组分的抗氧化活性

Table 4 Antioxidant activities of five enzymatic components

酶解组分	AH	NH	BH	PrH	PaH
DPPH 自由基清除能力/( $\mu\text{mol TE/g}$ )	27.36 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	26.73 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	28.39 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	22.34 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	23.12 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>
ABTS <sup>+</sup> 自由基清除能力/( $\mu\text{mol TE/g}$ )	175.46 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	147.33 $\pm$ 2.82 <sup>c</sup>	102.75 $\pm$ 2.33 <sup>c</sup>	152.28 $\pm$ 1.49 <sup>b</sup>	114.68 $\pm$ 3.00 <sup>d</sup>
ORAC 值/( $\mu\text{mol TE/mg}$ )	0.70 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>

注: 同行右肩不同小写字母表示具有显著性差异 ( $P<0.05$ )。DPPH 和 ABTS 试验中样品浓度均为 2 mg/mL, ORAC 试验中样品浓度为 62.5  $\mu\text{g/mL}$ 。

从以上结果可以看出, AH 的体外抗氧化活性整体上要优于其他蛋白酶酶解产物的抗氧化性。因此, 选择碱性蛋白酶对地龙蛋白预酶解后进行胃肠消化, 进一步探究其胃肠消化产物的抗氧化性。

## 2.4 地龙蛋白及其酶解产物的胃肠消化产物

### 抗氧化能力评价

#### 2.4.1 水解度与分子量分布

表 5 GEWP 和 GHEWP 的水解度

Table 5 The degree of GEWP and GHEWP

样品名称	GEWP	GHEWP
水解度/%	22.91 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	44.46 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>

注: GEWP、GHEWP 分别表示地龙蛋白直接消化产物、预酶解处理后的地龙蛋白消化产物, 右肩不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

表 6 GEWP、GHEWP 的分子量分布

Table 6 Molecular weight distribution of GEWP, GHEWP

分子量范围/u	含量/%	
	GEWP	GHEWP
>10 000	0.39	0.56
10 000~5 000	1.10	1.92
5 000~3 000	2.23	3.23
3 000~2 000	3.52	4.71
2 000~1 000	11.48	12.59
1 000~500	24.31	23.51
500~180	45.30	38.45
<180	11.67	15.02

GEWP 与 GHEWP 的水解度与分子量分布分别见表 5 和表 6。由表 5 可知, 与直接消化相比, 经预酶解处理后地龙蛋白的水解度得到了显著提高 ( $P<0.05$ ), 表明碱性蛋白酶预处理可以提高地龙蛋白的消化率。由表 6 可知, GEWP 与 GHEWP 分子量分布比较接近。但相比未经过胃肠消化处理的碱性蛋白酶酶解物的分

子量分布, 经胃肠消化后的酶解物的游离氨基酸含量明显增多, 分子量<3 ku 的片段所占比例略有下降, 这也表明经胃肠消化后, 碱性蛋白酶的酶解物得到进一步的降解。

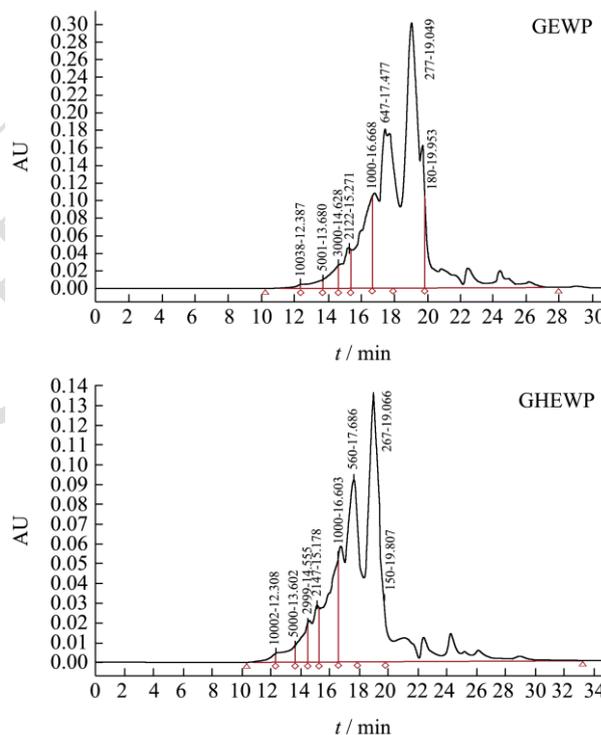


图 2 GEWP 和 GHEWP 的高效液相色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatogram of GEWP and GHEWP

#### 2.4.2 GEWP 与 GHEWP 的抗氧化活性

由图 3a 可知, GHEWP 的 DPPH 自由基清除能力显著高于 GEWP ( $P<0.05$ )。GHEWP 的 DPPH 自由基清除率为 50.63%, 换算成 Trolox 当量为 35.39  $\mu\text{mol TE/g}$ , 显著高于 AH, 相比于 GEWP (20.55  $\mu\text{mol TE/g}$ ) 清除率提高了 72.21%, 与刘廷强等<sup>[34]</sup>通过蚯蚓自溶酶解制备得到的小分子多肽在 5 mg/mL 时的清除能力相当。图 3a 中 ABTS 试验结果表明, GHEWP 的 ABTS 自由基清除能力显著低于

GEWP ( $P<0.05$ )。其中, GHEWP 的 ABTS 自由基清除能力低于 AH, 可能是因为 GHEWP 中的电子供体相比于 AH 要少。朱子昊在其研究中也发现, 利用碱性蛋白酶酶解小球藻蛋白, 酶解 8 h 的产物的 ABTS 自由基清除能力要低于酶解 4 h 所得产物<sup>[32]</sup>。图 3c 为 GEWP、GHEWP 和 AH 在氧自由基攻击下的荧光猝

灭曲线, 计算后可得, GEWP 和 GHEWP 的 ORAC 值分别为 0.35、0.77  $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$ 。GHEWP 的 ORAC 值相比于 GEWP 和 AH 分别提高了 120.00%、10.00%。

从结果可以看出, GHEWP 整体表现出的抗氧化活性要显著优于 GEWP, 说明相比于直接食用, 预酶解可显著增强地龙蛋白的抗氧化活性。

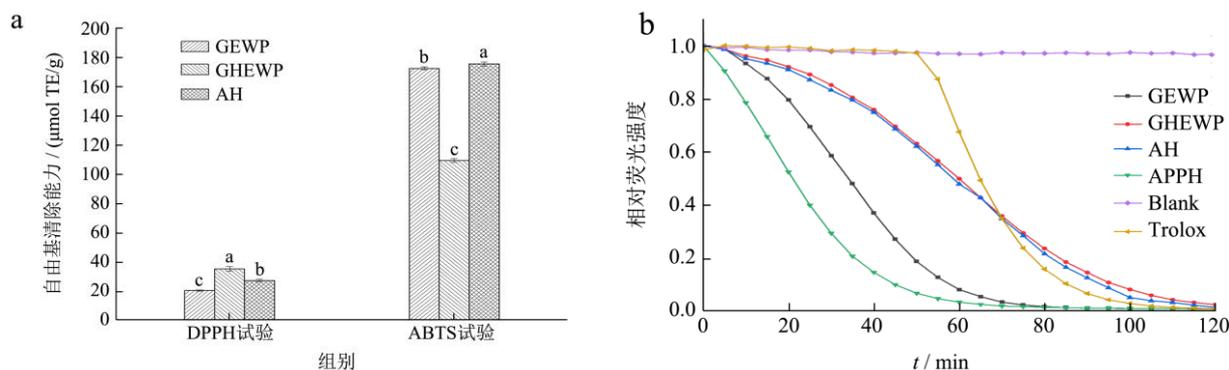


图 3 GEWP、GHEWP 的体外抗氧化活性

Fig.3 Antioxidant activity of GEWP, GHEWP *in vitro*

注: 不同小写字母表示在同一试验中具有显著性差异 ( $P<0.05$ )。DPPH 和 ABTS 试验中样品质量浓度均为 2 mg/mL, ORAC 试验中样品质量浓度为 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 7 抗氧化肽序列

Table 7 Antioxidant peptide sequence

编号	氨基酸序列	相对分子质量/u	电荷数	疏水性氨基酸个数	芳香族氨基酸个数
201	WIPRPPE	893.475 5	2	5	1
202	WMIRMS	854.369 1	2	4	1
203	ATSGFFVY	890.425 4	2	5	3
204	WVSPLH	737.385 5	2	4	1
205	PNGYTLF	810.400 6	2	5	2
206	YVPYLL	766.4232	2	6	2
207	HCFVLY	837.390 3	2	4	2
208	HLASGWY	832.378 6	2	4	2
209	HRYSDF	823.361 3	2	2	2
210	HYANMY	813.316 1	2	4	2
211	AWGLSGR	745.394 2	2	3	1

### 2.4.3 GHEWP 的 HPLC-MS/MS 分析

采用 LC-MS/MS 法检测 GHEWP 中  $M_w<3 \text{ ku}$  超滤组分的氨基酸序列, 扫描范围为 500~3 000 u。质谱原始文件转换处理后, 用 MASCOT 检索 uniprot 数据库, 得到 10 823 条肽 (见附件)。抗氧化肽的分子量一般在 500~2 000 u、氨基酸个数一般在 2~20<sup>[35]</sup>, 一共有 8 988 个肽符合上述特点, 占总数的 83.04%。通过 PeptideRank (<http://bioware.ucd.ie>) 计算肽具有生物活性的概率, 并通过 BIOPEP 数据库 (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/>) 预测肽的抗氧化活性片段和生物活性<sup>[36]</sup>, 选择 11 个潜在在抗氧化活性较强的肽进行合成并验证活性, 抗氧化肽序列相关信

息如表 7 所示。

11 个抗氧化肽的自由基清除能力见表 8。由表 8 可知, 在 11 个抗氧化肽中, 只有 207 具有很好的 DPPH 自由基清除能力, 显著强于 GHEWP ( $P<0.05$ ), 其余肽则基本无 DPPH 自由基清除能力; 在 ABTS 自由基清除实验中, 各肽的清除能力均要显著强于 GHEWP ( $P<0.05$ )。203、207、208、209、210 的 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力相较于其他样品差异显著 ( $P<0.05$ ); 在 ORAC 实验中, 除 206 外, 其余抗氧化肽的 ORAC 值均显著高于 GHEWP 与 GEWP ( $P<0.05$ )。综合比较 11 个抗氧化肽对 DPPH、ABTS 自由基的清除率以及 ORAC 值, 可以看出 203、207、

208、209、210 的抗氧化活性比较好。郑淋<sup>[37]</sup>的研究曾指出, 抗氧化肽中的 Cys 残基对清除 DPPH 自由基具有重要贡献, 不含 Cys 残基的抗氧化肽对 DPPH 自由基的清除能力较差, 抗氧化肽氨基酸序列中的 Tyr、Trp、Cys 及 Met 残基等对抗氧化肽清除 ABTS 和氧自由基具有重要贡献。本实验的结果与其结论相符, 在 11 个抗氧化肽中, 只有 207 的氨基酸序列中含有 Cys 残基, 因此其 DPPH 自由基清除能力较好, 其余抗氧化肽对 DPPH 自由基基本无清除能力, 203、207、208、

209、210 中疏水性氨基酸残和芳香族氨基酸残基高频率出现。目前普遍认为, 疏水性氨基酸的比例是影响抗氧化肽清除自由基能力的关键因素, N 端存在疏水性氨基酸残基是抗氧化肽的典型结构特征<sup>[38]</sup>。值得注意的是, 除 203、207、208、209、210 外, 其余抗氧化肽中疏水性氨基酸比例也很高, 但其余肽的抗氧化活性并不突出, 这说明氨基酸组成并不是影响抗氧化肽活性的唯一因素, 氨基酸序列、空间结构、溶解度等都可能影响抗氧化肽的活性<sup>[28]</sup>。

表 8 11 个肽的自由基清除能力

Table 8 Free radical scavenging ability of 11 peptides

编号	氨基酸序列	DPPH 自由基清除能力/( $\mu\text{mol TE/g}$ )	ABTS <sup>+</sup> 自由基清除能力/( $\mu\text{mol TE/g}$ )	ORAC 值/( $\mu\text{mol TE/mg}$ )
201	WIPRPPE	8.88 $\pm$ 0.18 <sup>i</sup>	305.90 $\pm$ 3.57 <sup>i</sup>	3.93 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>
202	WMIRMS	15.86 $\pm$ 0.31 <sup>e</sup>	298.06 $\pm$ 2.95 <sup>i</sup>	4.27 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>
203	ATSGFFVY	10.92 $\pm$ 0.36 <sup>e</sup>	752.69 $\pm$ 3.44 <sup>bc</sup>	1.82 $\pm$ 0.04 <sup>h</sup>
204	WVSPLH	14.04 $\pm$ 0.16 <sup>f</sup>	350.55 $\pm$ 8.55 <sup>h</sup>	4.34 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>
205	PNGYTFL	9.14 $\pm$ 0.55 <sup>h</sup>	567.35 $\pm$ 12.47 <sup>f</sup>	1.8 $\pm$ 0.08 <sup>h</sup>
206	YVPYLL	13.68 $\pm$ 0.38 <sup>e</sup>	593.65 $\pm$ 8.36 <sup>e</sup>	0.64 $\pm$ 0.07 <sup>i</sup>
207	HCFVLY	125.72 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	798.72 $\pm$ 3.41 <sup>a</sup>	1.95 $\pm$ 0.11 <sup>g</sup>
208	HLASGWY	16.27 $\pm$ 0.22 <sup>d</sup>	732.29 $\pm$ 8.17 <sup>c</sup>	4.55 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
209	HRYSDF	9.38 $\pm$ 0.41 <sup>g</sup>	669.19 $\pm$ 7.30 <sup>d</sup>	2.36 $\pm$ 0.12 <sup>f</sup>
210	HYANMY	19.41 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>	765.80 $\pm$ 7.30 <sup>b</sup>	5.01 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
211	AWGLSGR	8.26 $\pm$ 0.50 <sup>j</sup>	410.39 $\pm$ 0.96 <sup>g</sup>	3.59 $\pm$ 0.19 <sup>e</sup>

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异( $P<0.05$ )。DPPH 试验中样品浓度为 1 mg/mL, ABTS 试验中样品浓度为 0.5 mg/mL, ORAC 试验中样品浓度为 15.625  $\mu\text{g/mL}$ 。

#### 2.4.4 抗氧化肽活性位点推测

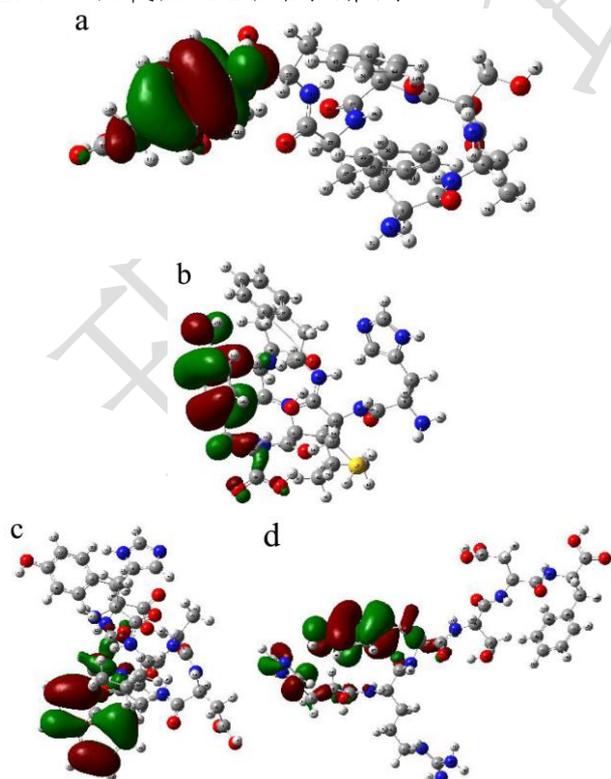


图 4 五个抗氧化肽的 HOMO 分布

Fig.4 HOMO distribution of five antioxidant peptides

注: a 为 ATSGFFVY; b 为 HCFVLY; c 为 HLASGWY; d 为 HRYSDF; e 为 HYANMY。

选择 2.4.3 中的 203、207、208、209、210 进行抗氧化活性位点分析。分子轨道理论认为, 分子进行化学反应时只和前线分子轨道及其附近的轨道有关。HOMO 是与亲核试剂反应的重要前线轨道, 吸氢/吸电的自由基属于亲核试剂, 因此认为抗氧化肽的 HOMO 是与自由基反应的活性位点<sup>[22]</sup>。分子结构理论认为, 分子在极性溶剂中的解离受化学键上电荷差值影响, 化学键上的电荷差值越大、分子在极性溶剂中就越容易解离, 电负性强的原子利于向亲核试剂供电<sup>[39]</sup>。结合分子的 HOMO 分布, 通常认为抗氧化剂

活性位点为 HOMO 区域的电荷最集中部位<sup>[40]</sup>。图 4 为五个抗氧化肽的 HOMO 分布图。由图 4 可以看出, ATSGFFVY、HCFVLY、HRYSDf、HYANMY 等四个肽的 HOMO 都主要集中在 Tyr 上。Tyr 结构中酚羟基上的氧可与苯环形成 p- $\pi$  共轭, 酚羟基氧上的负电荷可以游离到苯环的碳上使氧上的负电荷分散, 氧电子云密度减弱, 则酚羟基更易释放其氢质子从而终止自由基链式反应, 而 Tyr 自身可通过共振以维持稳定。HLASGWY 的 HOMO 主要分布于 Trp-6 的吲哚基侧链上, 其吲哚基上具有流动性较强的共轭电子体系,

可以释放活泼氢实现抗氧化作用。表 9 为 ATSGFFVY、HCFVLY、HRYSDf、HYANMY 中酪氨酸上苯酚基原子的净电荷分布和 HLASGWY 中吲哚基上原子的净电荷分布。从表 9 中可以看出: TSGFFVY、HCFVLY、HRYSDf、HYANMY 酪氨酸的酚羟基中 O 原子净电荷值最大, 因此推测这四个肽的主要活性位点分别为 O<sub>58</sub>-H<sub>114</sub> (Tyr-8)、O<sub>49</sub>-H<sub>101</sub> (Tyr-6)、O<sub>28</sub>-H<sub>83</sub> (Tyr-3)、O<sub>87</sub>-H<sub>35</sub> (Tyr-2); HLASGWY 吲哚基中 N 原子的净电荷值最大, 因此推测, HLASGWY 的活性位点为 N<sub>48</sub>-H<sub>102</sub> (Trp-6)。

表 9 五个抗氧化肽的部分原子净电荷分布

Table 9 Partial atomic net charge distribution of five antioxidant peptides

ATSGFFVY		HCFVLY		HLASGWY		HRYSDf		HYANMY	
原子	净电荷(e)								
O <sub>58</sub>	-0.643 684	O <sub>49</sub>	-0.674 835	C <sub>42</sub>	-0.235 035	O <sub>28</sub>	-0.679 356	C <sub>81</sub>	0.215 684
C <sub>59</sub>	-0.204 968	C <sub>50</sub>	-0.257 464	C <sub>43</sub>	-0.175 386	C <sub>29</sub>	-0.204 990	C <sub>82</sub>	-0.191 045
C <sub>60</sub>	-0.195 158	C <sub>51</sub>	-0.166 996	C <sub>44</sub>	-0.174 396	C <sub>30</sub>	-0.185 090	C <sub>83</sub>	-0.207 891
C <sub>61</sub>	0.306 307	C <sub>52</sub>	0.383 136	C <sub>45</sub>	-0.182 442	C <sub>31</sub>	0.376 752	C <sub>84</sub>	0.339 345
C <sub>62</sub>	-0.223 604	C <sub>53</sub>	-0.206 690	C <sub>46</sub>	0.056 887	C <sub>32</sub>	-0.217 100	C <sub>85</sub>	-0.139 324
C <sub>63</sub>	-0.194 571	C <sub>54</sub>	-0.188 614	C <sub>47</sub>	0.295 817	C <sub>33</sub>	-0.188 486	C <sub>86</sub>	-0.193 260
C <sub>64</sub>	0.104 413	C <sub>55</sub>	0.175 690	N <sub>48</sub>	-0.682 235	C <sub>34</sub>	0.226 895	O <sub>87</sub>	-0.687 879
				C <sub>49</sub>	-0.011 552				
				C <sub>50</sub>	-0.011 552				

### 3 结论

本研究发现预酶解可有效增加地龙蛋白的可消化性, 提高地龙蛋白胃肠消化产物的抗氧化活性。碱性蛋白酶对地龙蛋白的酶解能力最强, 生成的产物抗氧化活性最强。经碱性蛋白酶预酶解得到的消化产物中鉴定出五个综合抗氧化活性较好的肽: ATSGFFVY、HCFVLY、HLADGWY、HRYSDf, 分析这五个抗氧化肽的活性位点, 结果表明抗氧化肽中的酪氨酸和色氨酸对肽的抗氧化性具有重要贡献。以上研究结果表明预酶解处理的加工方式可改善地龙蛋白的可食用性, 提高其营养学价值, 并为源于地龙蛋白的生物活性肽的研究提供了一定参考。

### 参考文献

- [1] 李思维, 郝二伟, 杜正彩, 等. 广地龙化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(8): 2560-2571.
- [2] 黄庆, 李志武, 马志国, 等. 地龙的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 220-226.
- [3] 彭劲甫, 杨得坡, 黄世亮, 等. 地龙的药理作用与保健功能[J]. 中药材, 2000, 23(2): 114-117.

- [4] 李予蓉, 郭国祯, 谢艳华, 等. 地龙胶囊对丝裂霉素治疗小鼠移植瘤的增效作用[J]. 第四军医大学学报, 2000, 1: 133-134.
- [5] 许超千, 焦军东, 孙宏丽, 等. 蚓激酶对实验动物血栓及相关血液学指标的影响[J]. 中草药, 2005, 9: 91-93.
- [6] 潘敏娟, 赵阳春, 毛水龙. 地龙对小鼠血管紧张素转换酶活性的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2006, 11: 667-668.
- [7] 郭金洲, 陈海宁, 马晶鑫, 等. Nrf2 信号通路在氧化应激所致动脉粥样硬化防治中的作用研究进展[J]. 贵州中医药大学学报, 2022, 44(2): 71-75.
- [8] Remziye-Aysun Kepekci, Polat Sait, Celik Ahmet, et al. Protective effect of spirulina platensis enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl<sub>4</sub> [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 1972-1979.
- [9] Jiayao-Y Wang, Li Jiaqi-Q, Xiao Yumei-M, et al. Triphenylphosphonium (TPP)-based antioxidants: a new perspective on antioxidant design [J]. Chem Med Chem, 2020, 15(5): 404-410.
- [10] Laetitia-L-S Canabady-Rochelle, Selmecci Katalin, Collin Sabrina, et al. SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties [J]. Food Chemistry, 2018, 23(9): 478-485.
- [11] 郭征兵. 中药地龙的药理作用及活性成分分析[J]. 当代医学,

- 2017,23(19):199-200.
- [12] Di Wu, Wu Chao, Tu Maolin, et al. Identification and analysis of bioactive peptides from scallops (*Chlamys farreri*) protein by simulated gastrointestinal digestion [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2018, 42(9): e13760.1-e13760.10.
- [13] Daniel-Joner Daroit, Brandelli Adriano. *In vivo* bioactivities of food protein-derived peptides - a current review [J]. Current Opinion in Food Science, 2021, 39: 120-129.
- [14] F Javier Espejo-Carpio, Garcia-Moreno Pedro-J, Perez-Galvez Raul, et al. Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates [J]. International Dairy Journal, 2016, 54: 21-28.
- [15] 马思彤,刘静波,张婷,等.体外模拟胃肠消化及碱性蛋白酶处理后蛋清肽抗氧化活性差异及肽序列解析[J].食品科学,2020,41(21):113-120.
- [16] 孙崇臻.桑叶抗氧化肽的酶法制备、结构鉴定及免疫活性分析[D].广州:华南理工大学,2017.
- [17] Andre Brodkorb, Egger Lotti, Alminger Marie, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion [J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991-1014.
- [18] 罗艳华,王全杰,陈沛海,等.蛋白水解物水解度测定方法的研究[J].皮革与化工,2017,34(2):26-31.
- [19] Xin Lu, Zhang Lixia, Sun Qiang, et al. Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame (*Sesamum indicum* L.) protein hydrolysate [J]. Food Research International, 2019, 116: 707-716.
- [20] Ribang Wu, Huang Jiafeng, Huan Ran, et al. New insights into the structure-activity relationships of antioxidative peptide PMRGGGGYHY [J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127678.1-127678.8.
- [21] Serena Martini, Conte Angela, Tagliazucchi Davide. Comparative peptidomic profile and bioactivities of cooked beef, pork, chicken and turkey meat after *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Journal of Proteomics, 2019, 208.
- [22] Huifan Liu, Liang Jiayi, Xiao Gengsheng, et al. Active sites of peptides Asp-Asp-Asp-Tyr and Asp-Tyr-Asp-Asp protect against cellular oxidative stress [J]. Food Chemistry, 2022, 366(4): 130626.
- [23] 胡学智,王俊.蛋白酶生产和应用的进展[J].工业微生物,2008,4:49-61.
- [24] 芦鑫,姜梦楠,张丽霞,等.制备芝麻抗氧化肽的蛋白酶筛选[J].中国油脂,2018,43(11):28-33.
- [25] 任尧.宽体金钱蛭/东亚钳蝎分离蛋白中抗凝血、抗疲劳活性肽的酶法制备及其结构鉴定研究[D].广州:华南理工大学,2015.
- [26] Suphat Phongthai, D'Amico Stefano, Schoenlechner Regine, et al. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Food Chemistry, 2018, 240: 156-164.
- [27] Thanasak Sae-leaw, Benjakul Soottawat. Antioxidant activities of hydrolysed collagen from salmon scale ossein prepared with the aid of ultrasound [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53(12): 2786-2795.
- [28] Li Feng, Peng Fei, Wang Xiaojing, et al. Identification and characterization of antioxidative peptides derived from simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of walnut meal proteins [J]. Food Research International, 2019, 116: 518-526.
- [29] Nattakarn Wongsrangsap, Chukiatsiri Suttida. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatically hydrolysed *Samia ricini* pupae [J]. Molecules, 2021, 26(9): 2588.
- [30] Sara Benede, Molina Elena. Chicken egg proteins and derived peptides with antioxidant properties [J]. Foods, 2020, 9(6): 735-750.
- [31] Fatemeh Bamdad, Wu Jianping, Chen Lingyun. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein [J]. Journal of Cereal Science, 2011, 54(1): 20-28.
- [32] 朱子昊.小球藻抗氧化肽的制备及其在苹果汁中的应用[D].泰安:山东农业大学,2021.
- [33] K-M Schaich, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 111-125.
- [34] 刘廷强,严泽民,周华峰,等.蚯蚓小分子多肽提取物的制备及抗氧化活性[J].江苏农业科学,2016,44(7):463-466.
- [35] Tangbin Zou, He Taiping, Li Huabin, et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins [J]. Molecules, 2016, 21(1): 72-85.
- [36] Yue Chen, Han Peng, Ma Bin, et al. Effect of thermal treatment on the antioxidant activity of egg white hydrolysate and the preparation of novel antioxidant peptides [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2022, 57(5): 2590-2599.
- [37] 郑淋.抗氧化肽的构效关系及定向制备的研究[D].广州:华南理工大学,2015.
- [38] Bahareh-H Sarmadi, Ismail Amin. Antioxidative peptides from food proteins: A review [J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956.
- [39] Chaoting Wen, Zhang Jixian, Zhang Haihui, et al. Study on the structure-activity relationship of watermelon seed antioxidant peptides by using molecular simulations [J]. Food Chemistry, 2021, 364: 130432.1-130432.7.
- [40] Shinichi Nagaoka, Kuranaka Aya, Tsuboi Hideki, et al. Mechanism of antioxidant reaction of vitamin E: charge transfer and tunneling effect in proton-transfer reaction [J]. The Journal of Physical Chemistry, 1992, 96(6): 2754-2761.